

## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

## NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Assistant Commissioner for Patents  
United States Patent and Trademark  
Office  
Box PCT  
Washington, D.C. 20231  
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

<b>Date of mailing</b> (day/month/year) 22 June 2000 (22.06.00)	
<b>International application No.</b> PCT/JP99/06197	<b>Applicant's or agent's file reference</b> PC-8296
<b>International filing date</b> (day/month/year) 08 November 1999 (08.11.99)	<b>Priority date</b> (day/month/year) 10 November 1998 (10.11.98)
<b>Applicant</b> YURA, Hirofumi et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:  
01 June 2000 (01.06.00)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:  
\_\_\_\_\_

2. The election ☒ was  
☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO  
34, chemin des Colombettes  
1211 Geneva 20, Switzerland

Maria Kirchner



## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING  
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and  
Administrative Instructions, Section 422)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

SONODA, Yoshitaka  
Time-24 Building  
4th floor W-1  
45, Aomi 2-chome  
Koto-ku, Tokyo  
135-8073  
JAPON

<b>Date of mailing</b> (day/month/year) 28 June 2000 (28.06.00)	<b>IMPORTANT NOTIFICATION</b>
<b>Applicant's or agent's file reference</b> PC-8296	
<b>International application No.</b> PCT/JP99/06197	<b>International filing date</b> (day/month/year) 08 November 1999 (08.11.99)

1. The following indications appeared on record concerning:		
<input type="checkbox"/> the applicant	<input type="checkbox"/> the inventor	<input checked="" type="checkbox"/> the agent
<input type="checkbox"/> the common representative		
<b>Name and Address</b> 1) SHIGA, Masatake 2) WATANABE, Takashi OR Building 23-3, Takadanobaba 3-chome Shinjuku-ku Tokyo 169-8925 Japan	<b>State of Nationality</b>	<b>State of Residence</b>
	<b>Telephone No.</b> 03-5330-6011	
	<b>Facsimile No.</b> 03-5330-6061	
	<b>Teleprinter No.</b>	
2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:		
<input checked="" type="checkbox"/> the person	<input type="checkbox"/> the name	<input type="checkbox"/> the address
<input type="checkbox"/> the nationality	<input type="checkbox"/> the residence	
<b>Name and Address</b> 1) SONODA, Yoshitaka 2) KOBAYASHI, Yoshinori Time-24 Building 4th floor W-1 45, Aomi 2-chome Koto-ku, Tokyo 135-8073 Japan	<b>State of Nationality</b>	<b>State of Residence</b>
	<b>Telephone No.</b> 03-5331-5218	
	<b>Facsimile No.</b> 03-5331-5219	
	<b>Teleprinter No.</b>	
3. Further observations, if necessary: <b>The agents in Box 1 should be deleted as an agent of record and be replaced by the new agents identified in Box 2.</b>		
4. A copy of this notification has been sent to:		
<input checked="" type="checkbox"/>		

The International Bureau of WIPO  
34, chemin des Colombettes  
1211 Geneva 20, Switzerland

Authorized officer

Masashi HONDA

The first part of the paper discusses the importance of the study and the objectives of the research. It highlights the need for a comprehensive understanding of the subject matter and the role of the researcher in this process. The second part of the paper presents the methodology used in the study, including the data collection methods and the analysis techniques. The third part of the paper discusses the results of the study and the conclusions drawn from the findings. The fourth part of the paper discusses the implications of the study and the future research directions. The fifth part of the paper discusses the limitations of the study and the strengths of the research. The sixth part of the paper discusses the contributions of the study to the field of research. The seventh part of the paper discusses the ethical considerations of the study and the measures taken to ensure the integrity of the research. The eighth part of the paper discusses the acknowledgments of the study and the contributions of the participants. The ninth part of the paper discusses the references of the study and the sources of the information. The tenth part of the paper discusses the appendices of the study and the additional information provided.

PCT

EP US

国際調査報告

(法 8 条、法施行規則第40、41条)  
[PCT 18条、PCT規則43、44]

出願人又は代理人 の書類記号 PC-8296	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220) 及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP99/06197	国際出願日 (日.月.年) 08.11.99	優先日 (日.月.年) 10.11.98
出願人(氏名又は名称) 株式会社 ネーテック		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT 18条)の規定に従い出願人に送付する。  
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 2 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

## 1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこ

第        図に示す、☐ 出願人が示したとおりである。

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。



## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.<sup>8</sup> C08B37/08

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.<sup>8</sup> C08B37/08

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP, 4-1139, A (日本曹達株式会社), 6.1月.1992 (06.01.92), (ファミリーなし)	1-12
A	JP, 7-90245, A (第一製網株式会社), 4.4月.1995 (04.04.95), (ファミリーなし)	1-12
A	JP, 56-84701, A (株式会社興人), 10.7月.1981 (10.07.81), (ファミリーなし)	1-12

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

弘實 謙二

電話番号 03-3581-1101 内線 3492





<b>(51) 国際特許分類6</b> <b>C08B 37/08</b>	<b>A1</b>	<b>(11) 国際公開番号</b> <b>WO00/27889</b>  <b>(43) 国際公開日</b> 2000年5月18日(18.05.00)
<b>(21) 国際出願番号</b> PCT/JP99/06197  <b>(22) 国際出願日</b> 1999年11月8日(08.11.99)  <b>(30) 優先権データ</b> 特願第10/319209 1998年11月10日(10.11.98) JP  <b>(71) 出願人</b> (米国を除くすべての指定国について) 株式会社 ネットテック(NETECH INC.)(JP/JP) 〒213-0012 神奈川県川崎市高津区坂戸3丁目2番1号 KSP東502 Kanagawa, (JP) <b>(72) 発明者 ; および</b> <b>(75) 発明者 / 出願人</b> (米国についてののみ) 由良洋文(YURA, Hirofumi)(JP/JP) 〒213-0001 神奈川県川崎市高津区久本3丁目12番 20-702号 Kanagawa, (JP) 斉藤芳夫(SAITO, Yoshio)(JP/JP) 〒236-0011 神奈川県横浜市金沢区長浜2丁目6番地19号 Kanagawa, (JP) 石原雅之(ISHIHARA, Masayuki)(JP/JP) 〒190-0033 東京都立川市一番町6丁目24番18号 Tokyo, (JP) 小野克明(ONO, Katsuaki)(JP/JP) 〒359-0035 埼玉県所沢市西新井町17-19-501 Saitama, (JP)		<b>(74) 代理人</b> 弁理士 志賀正武, 外(SHIGA, Masatake et al.) 〒169-8925 東京都新宿区高田馬場三丁目23番3号 ORビル Tokyo, (JP)  <b>(81) 指定国</b> AU, CA, JP, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE)  添付公開書類 国際調査報告書
<b>(54) Title: FUNCTIONAL CHITOSAN DERIVATIVE</b>  <b>(54) 発明の名称</b> 機能性キトサン誘導体  <b>(57) Abstract</b> A functional chitosan derivative which comprises a chitin/chitosan, which is a natural polysaccharide, and incorporated therein at least one of a saccharide, a photoreactive functional group, an amphipathic group, e.g., a polyoxyalkylene alkyl ether, and a glycosaminoglycan and which, due to the incorporation, has solubility in a neutral medium, self-crosslinkability, the property of highly containing water or healing wounds, and antithrombogenic properties. Namely, the derivative has various properties required of health care materials such as medical products and cosmetics.		

本発明は、天然由来の多糖類であるキチン・キトサン類に、糖類及び／または光反応性官能基及び／またはポリオキシアルキレンアルキルエーテルなどの両親媒性基及び／またはグリコサミノグリカン類を導入することによって、中性での可溶性、自己架橋性、高含水性、及び創傷治癒性や抗血栓性を付与し、医療製品や化粧品などのヘルスケア材料に求められる種々の特性を有するようにした機能性キトサン誘導体を提供する。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AL	アルバニア	EE	エストニア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LK	スリランカ	SG	シンガポール
AU	オーストラリア	FR	フランス	LR	リベリア	SI	スロベニア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LS	レソト	SK	スロバキア
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BB	バルバドス	GDE	グレンダ	LU	ルクセンブルグ	SZ	ス威士ランド
BE	ベルギー	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	TD	チャド
BG	ブルガリア	GH	ガーナ	MA	モロッコ	TG	トーゴ
BJ	ベナン	GM	ギニア	MC	モナコ	TJ	タジキスタン
BR	ブラジル	GN	ギニア・ビサウ	MD	モルドヴァ	TZ	タンザニア
BY	ベラルーシ	GR	ギリシャ	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
CA	カナダ	HR	クロアチア	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア共和国	TR	トルコ
CF	中央アフリカ	HU	ハンガリー	ML	マリ	TT	トリニダード・トバゴ
CG	コンゴ	ID	インドネシア	MN	モンゴル	UA	ウクライナ
CH	スイス	IE	アイルランド	MR	モーリタニア	UG	ウガンダ
CI	コートジボワール	IL	イスラエル	MW	マラウイ	US	米国
CM	カメルーン	IN	インド	MX	メキシコ	UZ	ウズベキスタン
CN	中国	IS	アイスランド	NE	ニジェール	VN	ベトナム
CR	コスタ・リカ	IT	イタリア	NL	オランダ	YC	ユーゴスラビア
CU	キューバ	JP	日本	NO	ノルウェー	ZA	南アフリカ共和国
CY	キプロス	KE	ケニア	NZ	ニュージーランド	ZW	ジンバブエ
DE	ドイツ	KP	北朝鮮	PL	ポーランド		
DK	デンマーク	KR	韓国	PT	ポルトガル		
				RO	ルーマニア		

## 明細書

## 機能性キトサン誘導体

## 技術分野

本発明は、新規な機能性キチン・キトサン誘導体に関し、さらに詳しくは、還元性末端を有する糖及び／または光官能性基及び／または両親媒性基を導入することにより、溶解性、ゲル化性、あるいはハイドロゲル形成性を改良したキトサン誘導体に関する。

## 背景技術

天然材料は概して組織親和性や生分解性などの生体適合性を有しているため、医療分野や化粧品分野などにおいて広く応用が試みられている。特に、塩類とのキレートや架橋反応によって固相化したり不溶性のハイドロゲルを形成させることによって様々な用途が想定される。

例えば、近年、糖鎖の機能に関する研究が活発化し、細胞の接着、ウイルスの感染などの生体認識に深く係わることが明らかとなってきた。哺乳類における糖質は、概して糖蛋白質や糖脂質などの複合体として存在し、その中の一部の糖鎖が特異的な機能発現などに寄与する。このため、このような糖鎖含有物質は高い生理活性を有する場合が多いが、実際には、取扱いやコスト的な問題が生じていた。

一方、糖質の多くは植物

アラビアゴム、ポリガラクトマンナン、アルギン酸などは植物

や褐藻類に含まれるもので、安価に大量採取することが可能な粘性の高い高分子物質である。また、キチン・キトサン類はカニ・エビなどの甲殻類の殻や昆虫の甲皮などに広く分布し、その構成糖であるグルコサミンは、感染や劣化を防御するエリシター（誘導因子）としての役割も果たしている。

これらの糖質は、極めて高い分子量を有する多糖体として存在し、同時に高い粘性を有するため、創傷被覆材、人工皮膚、口腔外科あるいは形成外科領域で用いられる補填材（インプラント）、止血材、接着材などの医療や保湿材などの化粧品分野での応用が試みられているが、蛋白質成分に比べて、溶媒に対する溶解性などの点で化学的に修飾することが困難であるため、その応用範囲は限られていた。

多糖類の中でも特徴的なキチン・キトサン類は、構成糖単位中にアミノ基を含むため、イソシアネート、アルデヒド、カルボジイミド、などの化学架橋剤と併用して創傷被覆材、癒着防止材、分解性吸収材などとして利用することが検討されている。

しかしながら、キチン質は水素結合に基づく結晶性により水不溶性であり、医療分野を含む広い産業分野で好適な実用に供するには、加水分解による低分子化や部分脱アセチル化をしなければならない。また、このようなキチン質の物性を改良するために積極的に脱アセチル化を施してアミノ基を露出した糖単位を増加させたキトサンは、希有機酸などを含む酸性溶媒に可溶であるが極めて粘稠であるため、加療処置の現場で良好な操作性を求められる創傷被覆や生体接着では扱いづらいものであった。また、粘稠なキトサン溶液は生理的 pH を維持しないので、治癒に係わる生理活性試薬などを自在に付加することが困

難であり、さらに、遊離の化学架橋剤の併用には毒性の問題などがあるため、医療を含むヘルスケア分野での使用は制限されていた。

#### 発明の開示

本発明者らは、鋭意検討を行った結果、ポリ-N-アセチルグルコサミンが少なくとも部分的に脱アセチル化された構造を有するキチン・キトサン類を構成するグルコサミン単位のアミノ基や水酸基の少なくとも一部に、還元性末端を有する糖類及び／または光反応性官能基及び／またはポリオキシアルキレンアルキルエーテル類等の両親媒性基及び／またはグリコサミノグリカンを結合させることによって、上記問題が悉く解決できることを見出し本発明を完成するに至った。

かくして、本発明は、少なくとも一部が脱アセチル化されたキチン・キトサン類を構成するグルコサミン単位のアミノ基の少なくとも一部に、第1の機能化として還元性末端を有する糖類、及び／または、第2の機能化として光反応性官能基、及び／または、第3の機能化として両親媒性基、第4の機能化としてグリコサミノグリカンを導入した機能性キトサン誘導体を提供する。ただし、前記第3の機能化としての両親媒性基は、当該キチン・キトサン類を構成するグルコサミン単位またはアセチルグルコサミン単位のアミノ基及び6位の水酸基の少なくとも一部に導入してもよい。本発明の機能性キトサン誘導体は、還

領域で水に可溶となり、光反応性官能基を導入することによっ

てキチン・キトサン類を不溶性の自己架橋体ならしめることができ、両親媒性基を導入することによって有利なゲル形成能及び高い含水性を達成することができ、グリコサミノグリカンを導入することによって癒着防止能を付与することができる。

本発明のキトサン誘導体は、組織適合性や創傷治癒効果があることが知られているキチン・キトサン類に、糖類及び／または光架橋性の基及び／または両親媒性の基を結合せしめることで、生理的 pH 領域での水溶性、光反応による共有結合的自己架橋（硬化）性あるいは分子間相互作用に基づく不溶性のゲル形成能が付与されたものであって、生理的 pH 領域で安全に生体組織に適応させることができるばかりでなく、任意の強度と含水性を有するハイドロゲル体を形成することが可能となる。しかも、本発明のキトサン誘導体を用いて形成されたハイドロゲルは、遊離の化学架橋剤を使用することなく安全であり、その高い含水・保水性により様々な生理活性物質を包接することができるので、例えば創傷被覆材、癒着防止材、止血材、体液や気体のシール材、ドラッグデリバリーの包接体、細胞のカプセル材などの医療分野、さらには皮膚や毛髪のプロテクタなどの化粧品分野等におけるヘルスケア材料として広く利用することができる。

#### 図面の簡単な説明

図 1 は、化合物 1-A1-a の IR スペクトルである。2250  $\text{cm}^{-1}$  にアジド基 ( $-\text{N}_3$ ) の吸収が見られる。

図 2 は、化合物 1-A1-a の  $^1\text{H}$ -NMR スペクトルである。7.2 及び 7.6 ppm にベンゼン環のピークが見られる。

図3は、化合物1-A1-aのUVスペクトルである。271nmにピークが見られる。

図4は、化合物1-bのUVスペクトルである。278nmにピークが見られる。

図5は、化合物1-cのUVスペクトルである。262nmにピークが見られる。

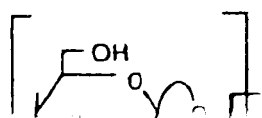
図6は、化合物1-A1-IのIRスペクトルである。840 $\text{cm}^{-1}$ に長鎖アルキル基のメチレン基の横ゆれ吸収が認められる。

図7は、化合物1-A1-a-IのIRスペクトルである。2250 $\text{cm}^{-1}$ にアジド基の吸収、840 $\text{cm}^{-1}$ に長鎖アルキル基のメチレン基の横ゆれ吸収が認められる。

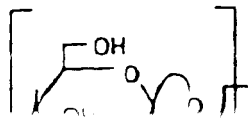
#### 発明を実施するための最良の形態

以下、本発明の機能性キトサン誘導体についてさらに詳細に説明する。

通常、キチン・キトサン類は、カニ殻由来のキチン質（ポリ-N-アセチルグルコサミン）をアルカリ処理することによって得られる脱アセチル化した酸可溶性画分であって、一般に下記式（1）、（2）で示される構成単位を有するものである（下記式中、Qは $\text{NHCOCH}_3$ である）。



(1)



(2)

なお、キチン・キトサン類のうち脱アセチル化度の低いもの（通常40%未満のもの）を「キチン」、そして脱アセチル化度の高いもの（通常40%以上のもの）を「キトサン」と呼ぶこともあるが、以下、本明細書では、少なくとも一部が脱アセチル化されたキチン・キトサン類を総称して「キトサン」という。なお、本発明におけるキトサンは天然由来のものに限らず、化学的または遺伝子工学的に合成された類似構造を有する化学修飾糖鎖であってもよい。

ここで、「脱アセチル化度」とは、キトサン（あるいは、ポリ-N-アセチルグルコサミン）を構成する糖単位の2位のアセチルアミノ基が脱アセチル化によって遊離アミノ基に変換されている割合である。本明細書では、脱アセチル化度は、「健康食品規格規準集（その4）」財団法人日本健康・栄養食品協会（1996年）第55頁に記載の「コロイド滴定法」によって定量される。

本発明のキトサン誘導体は、このキトサンをさらに化学的に修飾することにより機能化したものであり、原料として使用されるキトサンとしては、脱アセチル化度が少なくとも40%、特に60～100%、さらに特に65～95%の範囲にあるものが好適である。なお、脱アセチル化度が100%のキトサンは、上記式（1）の構成単位のみからなり、式（2）の構成単位は含まない。

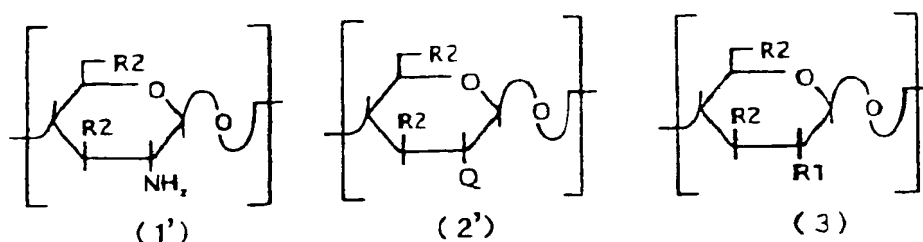
また、該キトサンの分子量には特に制限はなく、最終のキトサン誘導体の使用目的に応じて広い範囲で変えることができるが、一般には、数平均分子量が5,000～2,000,000、好ましくは10,000～から1,800,000、より好ましく



は 40,000 ~ 1,500,000 の範囲のものが適している。

本発明のキトサン誘導体は、上記キトサンを構成する式

(1) のグルコサミン単位 of 2 位のアミノ基、及び／または、式 (2) のアセチルグルコサミン単位 of 3 位または 6 位の水酸基の少なくとも一部に、還元性末端を有する糖類及び／または光反応性官能基及び／または両親媒性基を導入したものであって、下記の式 (1')、(2') 及び／または (3) で示される構成単位を含む (下記式中、R1 は、還元性末端を有する糖類残基または光反応性官能基または両親媒性基であり、R2 は、水酸基または両親媒性基であり、Q は前記定義の通りである)。



即ち本発明のキトサン誘導体は、還元性末端を有する糖類、光反応性官能基、両親媒性基、またはグリコサミノグリカン類の少なくともいずれかが導入されたものであり、上記式

(1') 及び (2') の構成単位からなるもの、(1') 及び (3) の構成単位からなるもの、(2') 及び (3) の構成単位からなるもの、並びに (1')、(2') 及び (3) のすべての構成単位からなるものを包含する。ただし、キトサン誘導体が (1') 及び (2') の構成単位のみからなる場合には、R2 の少なくとも一つは両親媒性基である。また、原料として用

構成単位を含まないことがあり、化学修飾の度合いによっては

式 (1') の構成単位を含まないこともある。即ち本発明のキトサン誘導体は、(3) の構造単位のみからなるものも包含する。また、本発明のキトサン誘導体は、一分子中に、還元性末端を有する糖類残基、光反応性官能基、両親媒性基、及びグリコサミノグリカンのいずれか 2、3、あるいは 4 つ全てを含む場合もある。

本発明に従い、第 1 の機能化としてキトサンの化学的修飾に使用される還元性末端を有する糖類としては、アルドース類、ケトース類が包含され、中でも、構成糖単位の数 が 20 個以下、特に 1 ～ 7 個のものが好適に使用される。具体的には、例えば、グルコース、フルクトース、ガラクトース、フコース、マンノース、アラビノース、キシロース、エリトロース、ヘブツロース、ヘキシロースなどのペンタオースやヘキサオース；グルコサミン、N-アセチルグルコサミン、ガラクサミンなどのアミノ糖類；ウロン酸類やデオキシ糖類などの糖誘導体；これらの単糖類を組み合わせた糖鎖からなる、マルトース、イソマルトース、ラクトース、メリビオース、マルトトリオースなどの二もしくは三糖類；各種オリゴ糖類などが挙げられるが、中でも、マルトース、ラクトース、メリビオースなどの中性二糖類が好適である。

上記糖類に換えて、ポリエーテル、多価アルコールなどの有機化合物をキトサンに誘導することもできるが、生体適合性などの面で天然の糖鎖を利用するのが好ましい。

キトサンの前記式 (1) のグルコサミン単位の 2 位アミノ基への上記の糖類の導入は、それ自体既知の方法を用いて行うことができ、例えば、糖類の還元性末端をカルボキシル化した後、

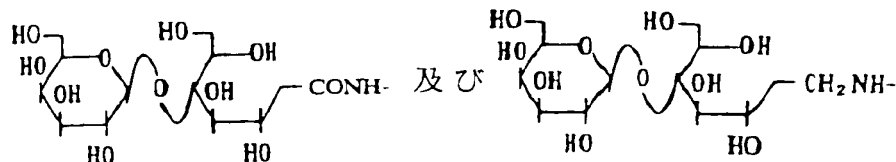
該 2 位アミノ基にアミド結合により結合させる方法（例えば、特開平 10-120705 号公報参照）や、糖類の還元性末端をアルデヒド化またはカルボニル化した後、グルコサミン単位 of 2 位アミノ基に、シッフ塩基を経由する還元アルキル化法により結合させる方法（例えば、キチン・キトサン研究会編「キチン・キトサンの応用」53～56 頁、1990 年 2 月 20 日、技法堂出版(株)発光参照）などが含まれる。

本発明でキトサンに導入される糖類は 1 種のみに限定されるものではなく、2 種以上を組み合わせ使用することもできる。

本発明のキトサン誘導体を構成する前記式 (3) の構成単位における R1 に含まれる糖側鎖の具体例としては、以下のものが上げられるが、これらに限られるわけではない。

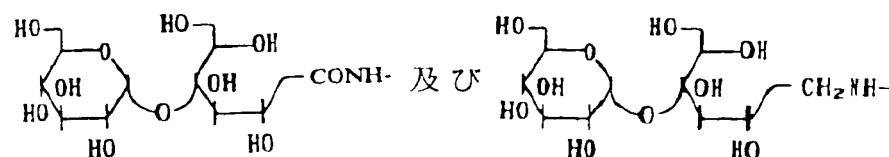
(i) ラクトース

から誘導される



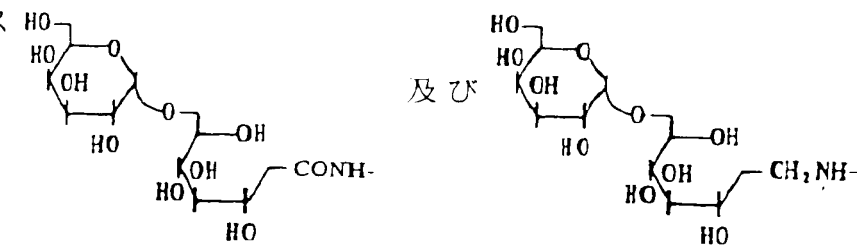
(ii) マルトース

から誘導される



(iii) メリビオース

から誘導される



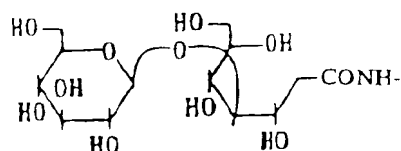
(vi) セロビオース

から誘導される

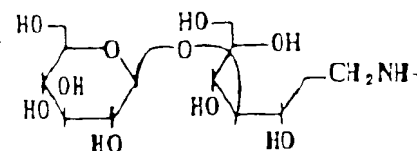


## (v) ラミナリビオース

から誘導される

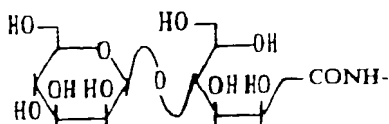


及び

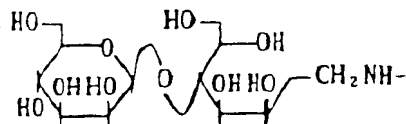


## (vi) マンノビオース

から誘導される



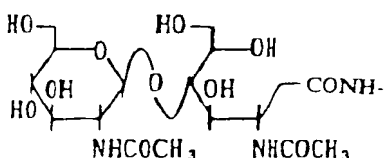
及び



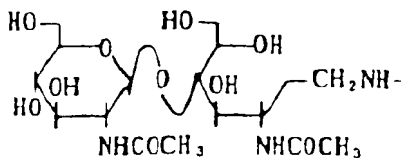
## (vii) N-アセチル

キトビオース

から誘導される



及び



上記(i)~(vii)の糖側鎖のうち、左側に記載したものが、糖のカルボキシル基とキトサンの2位アミノ基との縮合によって導入される残基を表し、右側に記載したものが、シッフ塩基を介して結合させた残基を表す。

このようにして、キトサンのグルコサミン単位の2位アミノ基を糖類で置換することにより、キトサンの酸依存的溶解性が緩和され、中性領域での可溶化が達成される。

キトサンのグルコサミン単位の2位アミノ基の糖側鎖による置換度は、最終のキトサン誘導体に望まれる物性などに応じて変えることができるが、置換度が、一般的には0.1~80%、特に0.5~60%、さらに特に1~40%の範囲内にあるのが好適である。ここで、糖側鎖の「置換度」は、キトサンを構成する糖単位の2位のアミノ基が糖側鎖で置換されている程度であり、キトサンを構成する糖単位の2位の遊離アミノ基と置換アミノ基の合計に対する置換アミノ基の割合として示す。本明細書では、糖側鎖の置換度は、硫酸中で糖鎖がフェノールと

反応することに基づく特徴的な発色を490nmの吸光度で検知する「フェノール-硫酸法」によって測定される(J.E.Hodge, B.T.Hofreiter, "Methods in Carbohydrate Chemistry", ed. by R.L.Whistler, M.L.Wolfrom, vol.1, p388, Academic Press, New York(1962)参照)。

また、本発明のキトサン誘導体は、第2の機能化として、キトサンを構成する前記式(1)のグルコサミン単位の2位アミノ基に光反応性官能基を導入することにより、光照射による自己架橋性が付与される。

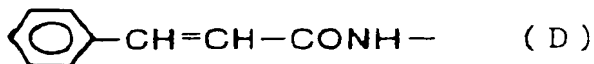
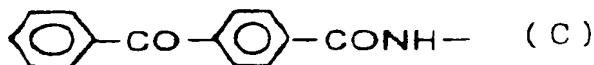
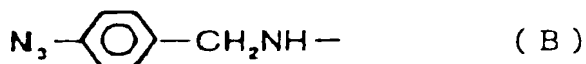
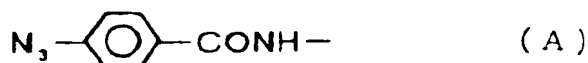
本発明に従ってキトサンの化学修飾に使用される光反応性官能基は、紫外線、特に200～380nmの近紫外領域を含む紫外線の照射によって該光反応性官能基同志で及び/又はキトサン中に存在するアミノ基あるいは水酸基などと反応して架橋結合を形成するような基であり、例えば、ベンゾフェノン類、ケイ皮酸類、アジド類、ジオレフィン類、ビスアントラセンのような環状不飽和化合物などから誘導されるものが包含され、特に、カルボニルアジド基、スルホニルアジド基、芳香族アジド基を有するものが好適である。

キトサンのグルコサミン単位の2位のアミノ基へのかかる光反応性官能基の導入は、それ自体既知の方法により行うことができ、例えば、カルボキシル基を有するアジド化合物を縮合剤の存在下に該2位のアミノ基に結合させる方法(特開平10-120705号公報参照)；酸クロリド基、アルデヒド基、N

990年2月20日、技報堂出版（株）発行、参照）等の方法により行うことができる。

なお、従来、アジド基の架橋反応において、ビスアジド以上の多官能性化合物が有効であるとされているが（特開平9-103481号公報参照）、本発明ではその必要はなく、モノアジド化合物の導入によっても、十分に自己架橋性を有するキトサン誘導体を得られる。

しかして、本発明のキトサン誘導体を構成する前記式（3）の構成単位における2位アミノ基に結合した光反応性官能基R1の具体例としては、例えば、下記式（A）から（D）で表されるものが挙げられる。式（A）の基は、p-アジド安息香酸から誘導されるものであり、式（B）の基は、p-アジドベンズアルデヒドから誘導されるものであり、式（C）の基は、p-ベンゾイル安息香酸から誘導されるものであり、そして、式（D）の基は、ケイ皮酸から誘導されるものである。



これらの光反応性官能基の導入の程度は、最終のキトサン誘導体に望まれる架橋反応に基づくゲル化（不溶化）の程度等に応じて変えることができるが、光反応性官能基の置換度が0.1%～80%、特に0.5～50%、さらに特に1～30%の範囲内にすることが望ましい。ここで、光反応性官能基の「置換

度」は、キトサンを構成する糖単位の2位のアミノ基が光反応性感応基で置換されている程度であり、キトサンを構成する糖単位の2位の遊離アミノ基と置換アミノ基の合計に対する置換アミノ基の割合である。本明細書では、光反応性官能基、例えばアジド基の置換度は、4-アジド安息香酸の270 nmにおける特性吸収から得られる検量線に基づいて決定することができる。

本発明のキトサン誘導体における糖側鎖と光反応性官能基の合計の置換度は、特に制限されるものではなく、広い範囲にわたり変えることができるが、一般には0.2～80%、好ましくは1.5～65%、さらに好ましくは3～50%の範囲内とすることができる。

また、本発明によれば、第3の機能化として、キトサンを構成する前記式(3)の糖単位の2位のアミノ基や、式(1')及び(2')の糖単位の3あるいは6位の水酸基の少なくとも一部に、両親媒性基を導入することにより、含水性を飛躍的に向上させた不溶性ハイドロゲルを得ることができる。この両親媒性基は、疎水性基を具備する疎水ブロックと親水基を具備する親水ブロックとを有する基であり、一般に界面活性剤機能を有する場合が多い。中でも、疎水ブロック(X)と親水ブロック(Y)の分子量の割合が、 $X:Y=1:5 \sim 5:1$ のものが好適に用いられ、解離性のイオン基を持たない非イオン性の基がより好適に使用できる。特に、疎水性のアルキルブロックと親

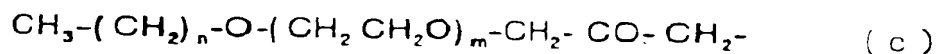
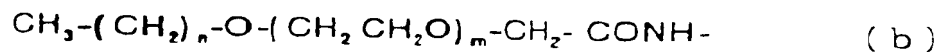
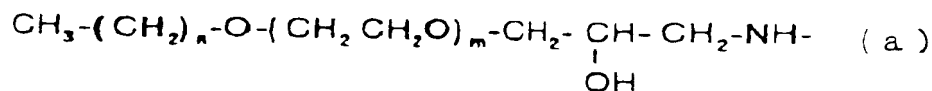
リオキシアルキレンアルキルエーテルが好ましい。疎水ブロッ

クを持たないポリエーテル類も使用できるが、疎水ブロックと親水ブロックの両方を有するポリオキシアルキレンアルキルエーテルが含水性向上の点から好ましい。

かかる両親媒性基のキトサンへの導入は、例えば、両親媒性基の親水ブロック又は疎水ブロックのいずれか一方の末端に、アミノ基と反応して共有結合を形成しうる基、例えば、アルデヒド基やエポキシ基などを持つ化合物を導入した後、キトサンのグルコサミンの2位アミノ基と反応させる方法や、カルボキシル基を有するポリオキシアルキレンアルキルエーテル誘導体とキトサンを縮合剤の存在下で反応させる方法、さらには酸クロリド基を有するポリオキシアルキレンアルキルエーテル誘導体とキトサンの水酸基やアミノ基と反応させる方法などを用いて行うことができる。

例えば、末端にエポキシ基を誘導したポリオキシアルキレンアルキルエーテル基をキトサンのアミノ基に導入した場合、前記式(4)における両親媒性基R<sup>2</sup>は、下記式(a)で表され、末端にアルデヒド基を誘導したポリオキシアルキレンアルキルエーテル基をキトサンのアミノ基に導入した場合、式(4)の両親媒性基R<sup>2</sup>は、下記式(b)で表される。また、末端に酸クロリド基を誘導したポリオキシアルキレンアルキルエーテル基をキトサンの3位または6位の水酸基に結合させた場合、前記式(1)～(4)における両親媒性基R<sup>2'</sup>またはR<sup>2''</sup>は、下記式(c)で表される。ただし、下記式(a)～(c)におけるn及びmは1以上の繰返し単位数である。





本発明のキトサン誘導体における両親媒性基の導入の程度は、特に制限されるものではないが、導入後のキトサン誘導体の重量変化に基づいて、通常5～70%、好ましくは15～55%の範囲内とすることができる。

さらに、本発明では、好ましくは糖側鎖及び光反応性官能基が導入されたキトサン誘導体に、第4の機能化として、グリコサミノグリカン類を導入することにより、創傷被覆材に求められる中心的な付加機能である治療促進などの機能をさらに付加、増強することができる。

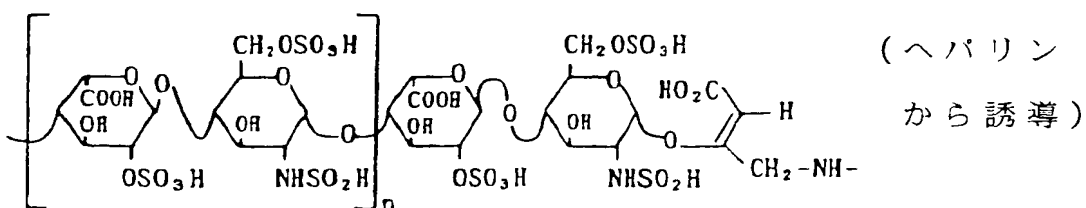
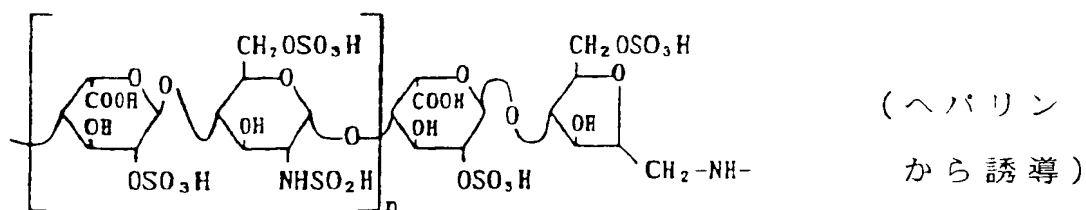
治癒促進効果は、創傷治療の他、スキンケア領域においてケラチノサイトの入れ替わり（ターンオーバー）を促進し、シワ防止に寄与する。

キトサンは、本来治癒促進効果を有することが示唆されているが、例えば、天然の酸性ムコ多糖類であるグリコサミノグリカンにキトサンの塩基性基とイオン複合化することによって更なる治癒促進が期待できることが報告されている（Krats等, *Scand J Plast Reconstr Hand Surg*, 31, 119-123 (1997)）。即ち、治癒の過程で生じる肉芽組織を構成する線維芽細胞や平滑筋細胞の増殖を促進する細胞成長因子がグリコサミノグリカンに結合し、その作用を促進する。

本発明におけるキトサンへのグリコサミノグリカンの導入は、従来のイオン複合化によるのではなく、前記式(1)のグルコサミン単位の2位アミノ基に、共有結合によって導入される。その結合法としては、例えば、前述した糖類の導入法と同じ方法を用いることもできるが、一般には、細胞増殖因子が結合する硫酸化糖を保存するため、過ヨウ素酸や亜硝酸分解によってグリコサミノグリカン類の生じるアルデヒド基を介した結合法が好適に用いられ得る。

この他、光照射によって不溶性の自己架橋化したキトサン膜に上記の化学反応を通して結合させることや、イオン複合化を介して結合させることも可能である。

このようにして導入されるグリコサミノグリカン類の具体例として、次式で表されるものを挙げることができるが、これらに限られるものではない。



本発明のキトサン誘導体におけるグリコサミノグリカン類の置換度は、特に限定されるものではないが、通常1～40%、好ましくは10～30%の範囲内とすることができる。

本発明のキトサン誘導体にあつては、還元性末端を有する糖類(第1機能)、光反応性官能基(第2機能)、両親媒性基

(第3機能)、及びグリコサミノグリカン類(第4機能)から、意図する用途に応じて、少なくとも1つの置換基を適宜選択して導入することができる。

例えば、光反応性官能基と両親媒性基とを同時に誘導すれば、より高い強度と含水性を合わせ持ったハイドロゲルを形成するキトサン誘導体を得ることができる。このようなキトサン誘導体は、ある程度の創傷治癒、癒着防止、保湿又は抗菌効果を有するキトサンを短時間に所望の強度で不溶性のゲル体とすることが可能な新規な機能性材料で、医療や化粧品といったヘルスケアの分野で幅広く応用できる。特に、糖類を導入したキトサン誘導体は中性領域での可溶性に優れており、生理的緩衝液や培地などで溶液化する事ができる。さらに、光反応性官能基を有するキトサン誘導体は、0.1重量%以上の濃度で粘稠な水溶液となり、組織に適用した後に所定強度の紫外線を照射することによって長くとも数分以内で不溶性ゲル体を形成し組織と密着する。従って、熱傷、外科的処理による組織欠損や開裂、抜歯における空洞、骨欠損部などに自由に塗布、埋植することができ、短時間の光照射によって直ちに不溶性の自己構造化に至り、体液や気体の遮断が可能となる。また、両親媒性基やグリコサミノグリカンを導入した、高い保水性と治癒促進効果を有する該キトサン誘導体は、熱傷や皮膚潰瘍において浸出液を適度にコントロールし感染を防御するので患者の加療期間と医療スタッフの労働を軽減することができる。

に近い水分を迅速に吸収し不溶性のゲル体を形成するほどの高

含水性なので、病的な臓器出血や外科処置後の出血を吸収し止血を可能にするほか、血管内止血によって腫瘍細胞の活動を抑制することなどに利用できる。このような両親媒性基を持つ本発明のキトサン誘導体は、生理活性物質や薬剤などを含む水溶液を吸収させて不溶性ゲルとした場合、胃で吸収されず腸内細菌や酵素でポリグルコサミン骨格が部分的に分解することによって位置特異的に薬物などを徐放する、ドラッグデリバリーシステムなどにも利用できる。

光反応性感応基を導入した場合、本発明のキトサン誘導体は、繊維製品や樹脂製シートなどに容易に塗布でき、光照射によって不溶化されるので、工業的に安価で機能的な表面改質材としても利用することができる。例えばグリコサミノグリカンをさらに導入しておけば、このような処理によって癒着防止機能が付与されたガーゼや包帯を作ることができるので、特に熱傷などにおいては創傷保護材の交換時に起こる二次的創傷の発生を効果的に抑制することもできる。

さらに、本発明のキトサン誘導体は、カテーテルを用いた非/低侵襲的な処理を可能にするほか、肌や毛髪において紫外線を吸収したり保湿効果を与える化粧品に至るまで極めて広いヘルスケア領域での応用ができる。

以下、本発明を実施例を用いてさらに具体的に説明するが、これらは本発明の範囲を何ら限定するものではない。

#### 実施例 1：キトサン誘導体の調製

(1) 還元性末端を有する糖類を導入したキトサン誘導体の調製 (第 1 機能化)

カニ由来のキチンをアルカリ処理によって脱アセチル化されたキトサン（脱アセチル化度80%、分子量100万、焼津水産化学工業株式会社製（以下「化合物1」という））125gを50mMのテラメチルエチレンジアミン（T E M E D）水溶液10リットルに分散させた後、56.25mlの塩酸を加えて溶解させた。このキトサン溶液に、水溶性カルボジイミド（E D C）32.5g、およびヨウ素化したラクトース20.25gを添加し、24時間室温で反応させた。反応液中の未反応の分子量10000以下の物質を限外濾過によって除去し、キトサンを構成するグルコサミン単位の2位アミノ基がラクトースに置換されたキトサン誘導体（以下、「化合物1-A1」という；ラクトース置換度は2%）を得た。また、ヨウ素化したラクトース及びE D Cの仕込量を、各々607.5g及び997.7gに変えた以外は上記と同様の方法を用いて、ラクトース置換キトサン誘導体（以下、「化合物1-A2」という；ラクトース置換度：40%）を得た。

ヨウ素化したラクトース20.25gをヨウ素化したマルトース20.0gに変えた以外は上記方法に準じてマルトース置換キトサン誘導体（以下、「化合物1-B1」という；ラクトース置換度：0.5%）を得た。また、ヨウ素化したマルトース及びE D Cの仕込量を、各々620.0g及び978.0gに変えて、マルトース置換キトサン誘導体（以下、「化合物1-B2」という；マルトース置換度：24%）を得た。

ヨウ素化したラクトース20.25gをヨウ素化したメリビオース20.0gに変えた以外は上記方法に準じてメリビオース置換キトサン誘導体（以下、「化合物1-C1」という；メリビオース置換度：0.5%）を得た。また、ヨウ素化したメリビオース及びE D

Cの仕込量を、各々620.0g及び978.0gに変えて、メリビオース置換キトサン誘導体（以下、「化合物1-C2」という；メリビオース置換度：37%）を得た。

（2）光反応性官能基を導入したキトサン誘導体の調製（第2機能化）

実施例1（1）で用いたキトサン（化合物1）1gを50mMのTEMED水溶液100mlに溶解させた。このキトサン溶液にEDC 0.7g、およびp-アジド安息香酸0.2gを添加し72時間反応させた。反応液中の未反応の分子量1000以下の物質を限外濾過によって除去し、キトサンを構成するグルコサミン単位の2位アミノ基がアジド化合物に置換されたキトサン誘導体（以下、「化合物1-a」という；p-アジド安息香酸の置換度：2.5%）を得た。

キトサン（化合物1）1gを50mMのTEMED水溶液100mlに溶解させた溶液に、水溶性カルボジイミド（EDC）0.7g、パラベンゾイル安息香酸0.27gあるいはケイ皮酸0.09gを添加し、各々72時間反応させた。反応液中の未反応の分子量10000以下の未反応物を限外濾過によって除去し、光反応性官能基としてパラベンゾイル安息香酸またはケイ皮酸を導入したキトサン誘導体（以下、各々、化合物「1-b」（置換度：1.3%）及び「1-c」（置換度0.5%）という）を得た。

次に、実施例1（1）で調製した化合物1-A1（2%ラクトース置換キトサン誘導体）及び化合物1-B1（0.5%マルトース置換キトサン誘導体）の各々1gを、50mMのTEMED水溶液100mlに別々に溶解させた。各キトサン誘導体溶液に、EDC 0.3

5g及びアジド安息香酸0.2gを添加し、72時間反応させた。反応液中の未反応の分子量10000以下の物質を限外濾過によって除去し、糖類及び光反応性官能基を導入した（第1及び第2機能化）キトサン誘導体（以下、各々、「化合物1-A1-a」及び「化合物1-B1-a」という；アジド安息香酸による置換度は、ともに2.5%）を得た。

（3）両親媒性基を導入したキトサン誘導体の調製（第3機能化）

実施例1（1）で用いたキトサン（化合物1）の塩酸塩1gを、純水40mlに溶解し、7.76gのラウリルアルコールポリエチレングリコール（繰返し単位が15）グリシジルエーテル（EX-171、ナガセ化成工業）を添加した。80度、24時間反応させた後、メタノールを過剰に添加しキトサン成分を再沈澱させた。透析後、凍結乾燥させ、両親媒性基を導入したキトサン誘導体（以下、「化合物1-I」という）を得た。

キトサン（化合物1）に換えて実施例1（1）で調製した化合物1-A1（ラクトース置換キトサン誘導体）を用いた以外は上記と同様にして、糖類及び両親媒性基（第1及び第3機能化）キトサン誘導体（以下、「化合物1-A1-I」という）を得た。

キトサン（化合物1）に換えて実施例1（2）で調製した化合物1-a（アジド安息香酸置換キトサン誘導体）を用いた以

I」という）を得た。

キトサン（化合物 1）に換えて実施例 1（2）で調製した化合物 1-A 1-a（ラクトース及びアジド安息香酸置換キトサン誘導体）を用いた以外は上記と同様にして、糖類及び両親媒性基（第 1、第 2、及び第 3 機能化）キトサン誘導体（以下、「化合物 1-A 1-a-I」という）を得た。

#### 実施例 2：キトサン誘導体の pH 溶解特性

実施例 1（1）で調製した糖類置換キトサン誘導体の 0.1% 水溶液の可溶化範囲を下記表 1 に示す。

表 1：可溶化する pH 領域

化合物	pH 領域
1	pH 4.0 以下
1-A 1	pH 7.5 以下
1-A 2	pH 13.0 以下
1-B 1	pH 6.8 以下
1-B 2	pH 13.0 以下
1-C 1	pH 6.8 以下
1-A 2	pH 13.0 以下

上記表 1 に示す通り、キトサンに対する二糖類の導入により、未処理のキトサン（化合物 1）で示される酸依存的なキトサンの水溶性は緩和され、中性領域での可溶性をあまねく獲得することができた。



### 実施例 3 : 水不溶性の自己構造体の形成能の評価

実施例 1 (2) 調製された化合物 1-a (アジド安息香酸置換キトサン誘導体)、並びに、化合物 1-A 1-a 及び 1-B 1-a (ラクトースまたはマルトース、及びアジド安息香酸置換キトサン誘導体) の各々 10  $\mu$ g を蒸留水に溶かして 1 重量 % 水溶液を調製し、ガラス製の板に置いた。直ちに 10~90 秒紫外線 (200~380nm、5.5mW/cm<sup>2</sup>) を照射した。この後、不溶化したキトサン誘導体ゲルを 100ml の蒸留水中に 24 時間浸漬して水可溶性のキトサンを溶出させて乾燥した。

紫外線照射の前後での重量変化を調べ、ゲル化率を求めた、その結果を下表 2 に示す。

表 2 : 光硬化性キトサンの不溶性ゲル化率

照射 時間	水洗後の残存重量 / 仕込重量		
	1-a	1-A1-a	1-B1-a
10 秒	0.61	0.61	0.58
30 秒	1.01	0.99	1.01
60 秒	1.00	1.00	0.98
90 秒	0.99	0.99	1.00

表 2 に示す通り、光反応性置換基を有する本発明の (第 2 機能化) キトサン誘導体は、30 秒という極めて短い紫外線照射でほぼ完全に不溶化した。

導体は、中性領域で可溶であるため、生理的 pH で溶液を調製

することができた。この第1及び第2機能化キトサン誘導体は、導入される二糖類の種類に依存することなく、同様の条件で不溶性ゲルの形成、即ち自己架橋性を示した。さらに、このような自己構造化から、より強い紫外線照射を用いれば、不溶性ゲルの形成時間が1秒程度以下まで短縮できることも明らかになった。

#### 実施例4：水不溶性のハイドロゲルの強度の評価

第2機能化したキトサン誘導体1-a、並びに、第1及び第2機能化キトサン誘導体1-A 1-aを用いて、各々、1、3、および5重量%水溶液を調製した。次に、2×3cmに裁断された厚さ2mmの食用ハム2枚を2×6cmになるように並べ、2枚のハムの境目を中心に2×2cm、厚さ2mmになるように、前記溶液を塗布した。

この後直ちに、塗布された1-a及び1-A 1-aに30秒間紫外線を照射して2枚のハムを接着させた。接着した2枚のハムの一方をクリップでスタンドに固定し、もう片方のハムの末端に漸次加重をかけ、1-a及び1-A 1-aが断裂する加重量を測定した。

比較例として、市販のフィブリン糊（「ペリプラスト」、ヘキスト・マリオン・ルセル社製）を用いて同様の処理を行った。

また、直径6mmのチューブの片端にハムを固定・密着させ、6mmの切れ目を設けて、厚さ2mmの1-aまたは1-A 1-aのシールを施し紫外線照射した。チューブの別の片端から空気を送りハムの切れ目から空気が漏れだしたときの圧力を測定した。

前者の実験でゲルが断裂したときの断面積あたりの加重、及

び、後者の実験で空気が漏れたときの圧力を下表 3 に示す。ただし、表 3 における加重及び圧力は以下のように定義する。

\* 加重：ハムを接着しているゲルが断裂したときの、ゲルの断面積あたりにかかる重量 ( $10^2 \text{ kg/m}^2$ )。

**\*\* 圧力：**圧縮された空気によってハムの切れ目を塞いでいるゲルから空気が漏れだしたときの単位面積当たりの圧力（Pa）。

表 3 : ハイドロゲルの強度

材 料	1 - a		1 - $\Lambda$ 1 - a		ペリプラスチック	
濃 度	加重*	圧力**	加重*	圧力**	加重*	圧力**
1%	1.8	3.2	1.4	4.7	4.0 (濃度4%)	- (濃度4%)
3%	3.1	3.7	2.8	3.7		
5%	4.2	4.6	4.3	4.3		

上記表 3 に示す結果から明らかな通り、アジド化合物を導入したキトサン誘導体は、短時間の紫外線照射で極めて高い強度の水不溶性のキトサンハイドロゲルを形成した。このとき全ての条件下で、ハム組織からキトサンゲルが剥離することは観察されなかった。これに対し、対照のペリプラストはハム組織からの剥離も伴った断裂を呈した。なお、第 1 機能化した 1-A1-a は、中性領域で水溶液を調製することができた。

また、不溶性キトサンゲルの強度は硬化させる前の水溶液の濃度によって簡単に制御することが出来る。

## 実施例 5 : 毛髪保護作用の評価

実施例 1 (2) で調製した光反応性官能基を有するキトサン誘導体 1-a (アジド安息香酸)、1-b (パラベンゾイル安息香酸) 及び 1-c (ケイ皮酸) を、1 : 1 : 1 で今後した混合物 (以下、「1-a b c」という) を調製した。

ヒト毛髪 0.25g を市販のシャンプーで洗浄し蒸留水でリンスした。乾燥後、湿度 95%、37℃ で 1 時間放置し、0.1 重量% の 1-a b c 水溶液に 10 分間浸漬した。処理した毛髪を濾紙上に展開して余剰の水溶液を吸収し、5 分間紫外線照射した。この後、紫外線照射された毛髪を蒸留水に 30 分間浸漬・洗浄し、湿度 95%、37 度下で 1 時間放置した。その後、1-a b c 処理の前後の毛髪重量を測定し比較した。対照として、未処理のキトサン (化号物 1) 及びラクトースのみを導入した 1-A 1 についても同様の評価を行った。結果を下表 4 に示す。

表 4

毛髪処理化合物	毛髪 1 グラム当たりの増加重量
1	0.09 g
1-A 1	0.11 g
1-a b c	0.15 g

上記表 4 に示すように、光反応性官能基を導入した本発明のキトサン誘導体は、紫外線を吸収することによって効果的に毛髪表面に不溶化・固定化され、高い水分保持を達成した。これは、本発明のキトサン誘導体が毛髪に対する保水および紫外線防御効果を持ち、長期コーティングを維持しながら毛髪に艶を与えることを示唆するものである。これに対して、糖類のみを

導入したキトサン誘導体 1-A 1 は水に可溶であるため、未処理のキトサン 1 に比較して有意な効果は見られなかった。

#### 実施例 6：止血能の評価

光反応性官能基（アジド安息香酸）を導入したキトサン誘導体 1-a、及び、さらに糖類（ラクトース）を導入したキトサン誘導体 1-A 1-a の、各々 1、3、および 5 重量 % 水溶液を調製した。ウイスター系ラット（雌、4 週齢）をペントバルビタール麻酔下で開腹し、肝臓 2 葉に対して深さ 2mm 長さ 2mm の切開創を設けた。直ちに門脈をクリップし出血をふき取り調製した水溶液を塗布した。ピンポイント型の紫外線照射装置（スポットキュア、ウシオ電気）で 30 秒間紫外線照射した後、クリップをはずし血流を再開した。このような一連の止血処理は 1 分以内に完了した。この結果、各濃度のキトサン溶液とも紫外線照射によって良好な不溶性のゲル形成を完了し、創面からの再出血を完全に阻止した。

次に、門脈よりカニューレを挿入し、0.5mM の EDTA を添加した PBS をペリスタリックポンプで注入した。直ちに腹部下大静脈を切断することによって肝臓内の血液を PBS で置換した。このとき、PBS 置換によって肝臓は黄褐色に変化するが、血流に障害が生じて鬱血している部位は PBS 置換が達成されず特有の赤褐色を維持する。

本試験では、切開創を本発明のキトサン誘導体ゲルで止血した部位に於て、出血が観察されず、創面からの再出血が完全に阻止された。

## 実施例 7 : 細胞応答の評価

第 2 機能化したキトサン誘導体 1-a、並びに、第 1 及び第 2 機能化したキトサン誘導体 1-A 1-a 及び 1-B 1-a の、各々 0.1 重量 % 水溶液を調製した。直径 35mm のポリスチレン製の培養皿に調製された各キトサン誘導体溶液の 1 ml を添加して 2 時間静置した。この後、溶液を廃棄し 5 分間紫外線照射し、PBS で 3 回洗浄した。

対照として、0.025 重量 % のファイブロネクチン (F) 及びゼラチン (G) 溶液を用いて、培養皿を吸着・コーティングしたものを用意した。また、未処理の培養皿 (N) も同時に用意した。

これらの培養皿に、ヒト臍帯由来の血管内皮細胞 (VEC)、新生児皮膚由来線維芽細胞 (FIB)、ラット冠状動脈由来平滑筋細胞 (SMC)、及び新生児由来表皮角化細胞 (KER) (ともにクロネティクス社) を  $10^6$  個播種し、37°C で 8 時間培養した。このときの細胞付着率を下表 5 に示す。

表 5 : 培養皿に付着した播種細胞の割合 (%)

処 理 物 質	V E C	F I B	S M C	K E R
N (未処理)	10	23	21	26
F (ファイブロネクチン)	47	48	47	48
G (ゼラチン)	46	44	47	48
1-a	8	10	11	34
1-A 1-a	8	5	7	31
1-B 1-a	8	4	21	37

表 5 に示されるように、血管内皮細胞、線維芽細胞、および平滑筋細胞などの内皮系の細胞は、本発明のキトサン誘導体に対し極めて抑制された接着傾向を示したが、上皮系の角化細胞は細胞接着蛋白質であるファイブロネクチンやゼラチンと同様の接着傾向を示した。ラクトースを導入したキトサン誘導体 1-A 1-a において最も高い細胞接着抑制傾向が観察された。

さらに、培養皿の中央に直径 15mm の円筒状の隔壁を設け、隔壁の外側をファイブロネクチン、内側をキトサン誘導体 1-a、1-A 1-a または 1-B 1-a で処理したものを用意した。外側のファイブロネクチン相に上記の細胞を播種し細胞を接着させた後、隔壁を取り除き長期培養を行ったところ、角化細胞以外は隔壁の内側に処理されたキトサン誘導体処理相に遊走せず、2週間後も増殖細胞が確認されなかった。このときの細胞の生存率は各培養皿とも極めて良好であった。

以上の結果は、本発明のキトサン誘導体が、創傷部位に不溶化処理された後、治癒過程で生じる肉芽組織の浸入を阻止して癒着を効果的に抑制する可能性を示唆している。このような硬化は、特に熱傷などの創傷において被覆材を安全に交換することや、冠動脈の再閉塞を防止するステント処理術における平滑筋細胞などの増殖における再閉塞を防止することなどに大きく寄与するものと思われる。

また、皮膚領域においては、表皮角化細胞の接着と遊走を実現することから、皮膚の再生を活発化し皺を退縮させる美肌効果も期待される。

また、キトサン誘導体は紫外線を吸収して反応するので紫外線防止に伴う美白効果なども期待で

きる化粧品原料となりうる。

#### 実施例 8 : 含水率の評価

実施例 1 (3) で調製した両親媒性基 (第 3 機能) のみを導入したキトサン誘導体 1-I、第 1 及び第 3 機能を導入したキトサン誘導体 1-A 1-I、第 2 及び第 3 機能を導入したキトサン誘導体 1-a-I、第 1、第 2、及び第 3 機能を導入したキトサン誘導体 1-A 1-a-I、並びに、比較用として未処理のキトサン (化合物 1) 及び糖類のみ導入した誘導体 (1-A 1) を用いて以下の実験を行った。

これらの凍結乾燥後の綿状乾燥体各 1g を 100cc 容量のフラスコに入れ、蒸留水 100ml を添加した。5 時間後、水分を吸収してゼリー状の透明ゲル体を形成した後、吸水しきれなかった水分を廃棄し、ゼリー状のゲル体の重量を測定した。結果を下表 6 に示す。

表 6 : キトサン誘導体の吸水量 (g)

材料	重量
キトサン (未処理)	5 時間後完全な水溶液となったため 測定不能
1-A 1 (ラクトース)	5 時間後完全な水溶液となったため 測定不能
1-I	7.2
1-A 1-I	7.5
1-a-I	7.0
1-A 1-a-I	6.8



表 6 に示されるように、両親媒性基（ポリオキシアルキレンアルキルエーテル基）を導入した本発明のキトサン誘導体は、自重の約70倍の水分を吸収する高含水性であることが明らかとなった。また、このような含水ゲル化は10秒以内に終了し、測定から5時間以後もゲル体は維持された。また、光反応性官能基と両親媒性基とを有する化合物 1-a-I は、紫外線照射によってより強度の高いゲル体となった。

#### 実施例 9：血液の固化試験

シトレート-ホスフェート-デキストロース（CPD）を添加して採血されたヒト新鮮血3mlに、本発明によって得られたキトサン誘導体 1-I 及び 1-a-I の綿状乾燥体0.1gを添加した。1-I 及び 1-a-I は、たちまち血液中の水分を吸収して不溶性の含水ゲル体を形成し、さらに、(I)-1-A に紫外線を照射した場合、組織表面とゲル体との接着性が向上した。これらの高含水性キトサン誘導体は、カテーテルや注射針を用いて血管内に注入されることによって含水膨潤し、効果的に血管の血流を停止できる。すなわち、腫瘍組織に対して誘導された脈管を閉塞させ腫瘍の成長を阻害する局所的ガン治療などに応用できることを示唆するものである。

#### 実施例 10：物質の包接

本発明によって調製された1gのキトサン誘導体 1-I 及び 1-a-I に、室温で飽和した水溶液（0.1%）の

を吸収し緑色のハイドロゲル体となった。これらのゲル体は、0.

1Mの酢酸緩衝液（pH4.0）、及び1N塩酸溶液（pH1）、あるいは1Nの水酸化ナトリウム溶液（pH13）下でも分解されなかった。

以上の結果は、本発明の高含水性キトサン誘導体は、水溶性の化合物を容易に吸収しカプセル化することができ、ある程度の非生理的条件下でも不溶性のゲル体を維持することが可能であるので、ドラッグデリバリーや薬物徐放体として医療や食品の分野で幅広い応用が期待できることを示唆している。

実施例 1 1：キトサン誘導体による表面処理（固相化キトサン誘導体の機能化）

（1）両親媒性基による表面潤滑化処理

本発明によって第1及び第2機能を付与されたキトサン誘導体 1-A 1-a の0.1重量%水溶液を調製し、ポリウレタンコートされた針金（直系2mm、長さ5cm、川澄化学工業）を当該水溶液に浸漬した。この後、直ちに5分間紫外線照射し、エタノールと水で洗浄した。1-A 1-a で処理されたウレタン線を、5重量%のラウリルアルコールポリエチレングリコール（15）グリシジルエーテル（EX-171；ナガセ化成工業）を含む炭酸緩衝液（pH 10）に浸漬し、80℃で20時間反応させた。反応後、エタノール及び蒸留水で洗浄し、両親媒性基で表面潤滑処理されたポリウレタン線（「1-A 1-a - (I)」とする）を得た。

得られた表面処理済みポリウレタン線 1-A 1-a - (I) を生理食塩水に30秒間漬けた後、2kg/cm<sup>2</sup>に調製した空気圧式掴み具にて、当該ポリウレタン線の表面潤滑処理部2cmを、1mm厚のシリコンシートを介して挟み、200mm/分の速度で引っ張り、

ポリウレタン線をシリコンシートの間から引き抜いたときの最大荷重を測定した。この最大荷重により表面の潤滑性を評価した。対照として、未処理のポリウレタン線（N）及びEX-171で処理していないポリウレタン線（1-A1-aでは処理済み）についても同様の測定を行った。その結果を表7に示す。

表7に示す通り、両親媒性基であるEX-171をで処理した表面は、潤滑性が向上して引き抜きやすくなっている。即ち、本発明の機能化キトサン誘導体は、光反応性官能基（第2機能）の導入により樹脂などの表面に容易に薄膜を形成することが可能であり、例えば両親媒性基などの更なる機能化は、製膜した後に実施することも可能であることが示された。製膜した後に潤滑性等の更なる機能を付加する表面改質が可能であることから、本発明のキトサン誘導体は、カテーテルやガイドワイヤーの表面処理にも好適に使用できるものである。

表7：ポリウレタン線の引き抜き最大荷重

表面処理	引き抜き最大荷重(k g f)
N（未処理）	2.00
1-A1-a	0.96
1-A1-a-(I)	0.18

## (2) グリコサミノグリカン（ヘパリン）による表面処理

本発明のキトサン誘導体1-A1-aを蒸留水に溶解させ、

最終濃度が1重量%となるようにジメチルスルホキシドを添加し、キトサン誘導体濃度1重量%の混合溶液を調製した。この混合溶液で、内径5mm、長さ5cmの塩化ビニル製チューブの内部を満たし、チューブの外部から24時間紫外線を照射した後、未反応の溶液を廃棄して蒸留水で洗浄した。このようにして、塩化ビニルチューブの内表面を1-A1-a膜で被覆処理した。

上記とは別に、公知の亜硝酸分解法によって還元末端にアルデヒド基を導入し、低分子化したヘパリン分画をゲル濾過によって得た。1mlの蒸留水に低分子化ヘパリン10mgとシアノ水素化ホウ素ナトリウム50mgを添加した水溶液を調製し、前記の洗浄したキトサン誘導体処理チューブに充填した。50℃で24時間反応させた後、チューブ内を0.01% T W E E N 20溶液で置換し、エタノールと蒸留水で洗浄して、ヘパリン化（第4機能化）塩化ビニルチューブ（1-A1-a-（H））を得た。

次いで、上記ヘパリン化チューブ1-A1-a-（H）内に、ヘパリンと結合して複合体を形成する0.0008% トルイジンブルー水溶液を満たし、ヘパリンに結合したトルイジンブルーの吸光度変化を640nmで測定した。対照として、未処理の塩化ビニルチューブ、及び、シアノ水素化ホウ素ナトリウムを用いないで低分子化ヘパリン処理を施したチューブ（即ち、低分子化ヘパリンが共有結合せず、単に表面に吸着しているもの、「1-A1-a/（H）」とする）を用いて同様の測定を行った。結果を表8に示す。

表 8 : トルイジンブルーの吸光度変化

表面処理	吸光度
無し	0 . 1 9
1 - A 1 - a / ( H )	0 . 1 6
1 - A 1 - a - ( H )	0 . 0 6

表 8 に示すとおり、グリコサミノグリカン類であるヘパリンを共有結合によって導入した本発明の機能化ヘパリン誘導体では、単に吸着させただけの場合に比較して高効率でヘパリンによる表面処理ができた。従って本発明のキトサン誘導体は、血液に触れるカテーテル、ガイドワイヤー、対外循環回路の医療機器の表面処理に好適に使用しうる。また、創傷被覆材においては、ヘパリンによる F G F などの細胞成長因子の活性化が達成されるので、創傷治癒促進効果が期待される。

なお、本実施例では、樹脂表面などに形成された光硬化膜の表面にグリコサミノグリカン類を導入したが、上述したように、製膜する前のキトサン分子にグリコサミノグリカン類を導入した後を使用することも可能である。

#### 産業上の利用可能性

本発明に係る機能化キトサン誘導体は、還元性末端を持つ糖類の導入（第 1 機能化）により生理的 pH での溶解性が得られ、光反応性官能基の導入（第 2 機能化）により光照射により

水性（吸水性）を飛躍的に向上させた不溶性ハイドロゲル形成

が可能となり、そして、グリコサミノグリカン類の導入（第4機能化）により、創傷治癒促進や抗血栓性を得ることができる。従って、本発明の機能化キトサン誘導体は、例えば、医療の分野においては生体組織に対する接合、液体・気体の遮断、癒着防止、塞栓症、埋込、潤滑材、薬効成分の徐放など、化粧品分野においてはスキンケアや毛髪保護などを含む、ヘルスケア材料として広範に利用できる。

## 請求の範囲

1. 少なくとも一部が脱アセチル化されたキチン・キトサン類を構成するグルコサミン単位の2位アミノ基の少なくとも一部に、還元性末端を有する糖類及び／または光反応性官能基及び／または両親媒性基及び／またはグリコサミノグリカン類を導入し、及び／または、当該キチン・キトサン類を構成するグルコサミン単位またはアセチルグルコサミン単位の3位及び／または6位の水酸基の少なくとも一部に両親媒性基を導入してなることを特徴とする機能性キトサン誘導体。

2. キチン・キトサン類の脱アセチル化度が少なくとも40%であることを特徴とする請求項1に記載の機能性キトサン誘導体。

3. 還元性末端を有する糖類が、構成糖単位の数が20個以下の糖類であることを特徴とする請求項1または2に記載の機能性キトサン誘導体。

4. 還元性末端を有する糖類が中性二糖類であることを特徴とする請求項3に記載の機能性キトサン誘導体。

5. 還元性末端を有する糖類の置換度が、0.1～80%であることを特徴とする請求項1から4のいずれかに記載の

6. 光反応性官能基が、カルボニルアジド基、スルホニルアジド基、芳香族アジド基から選択されることを特徴とする請求項 1 から 5 のいずれかに記載の機能性キトサン誘導体。

7. 光反応性官能基の置換度が 0.1 ~ 80 %であることを特徴とする請求項 1 から 6 のいずれかに記載の機能性キトサン誘導体。

8. 両親媒性基が、非イオン性基であることを特徴とする請求項 1 から 7 のいずれかに記載の機能性キトサン誘導体。

9. 両親媒性基が、ポリオキシアルキレンアルキルエーテル基であることを特徴とする請求項 8 に記載の機能性キトサン誘導体。

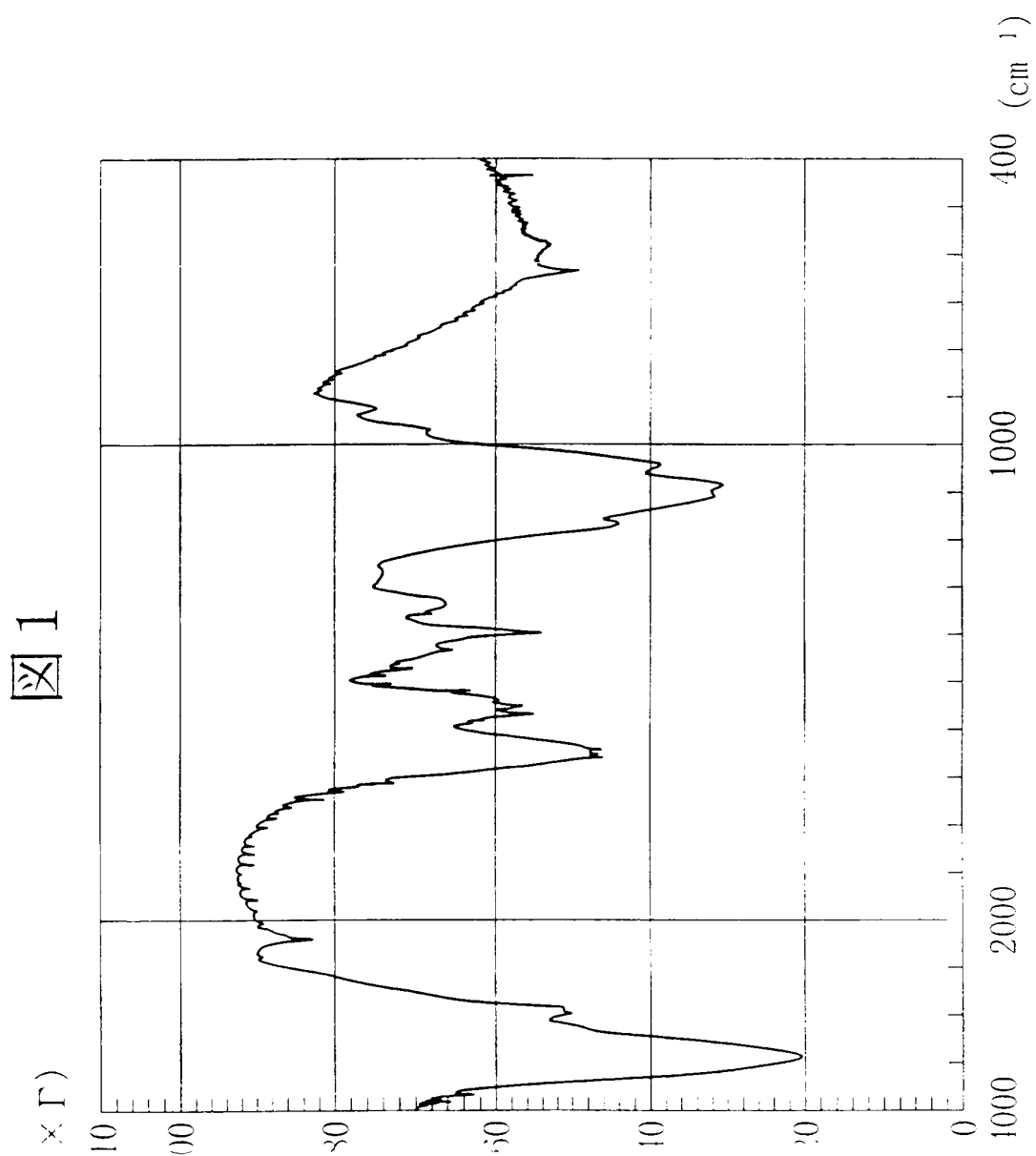
10. 両親媒性基の置換度が 5 ~ 70 %であることを特徴とする請求項 1 から 9 のいずれかに記載の機能性キトサン誘導体。

11. グリコサミノグリカン類がヘパリン誘導体であることを特徴とする請求項 1 から 10 のいずれかに記載の機能性キトサン誘導体。

12. 請求項 1 から 11 のいずれかに記載の機能性キトサン誘導体を含んでなるヘルスケア材料。



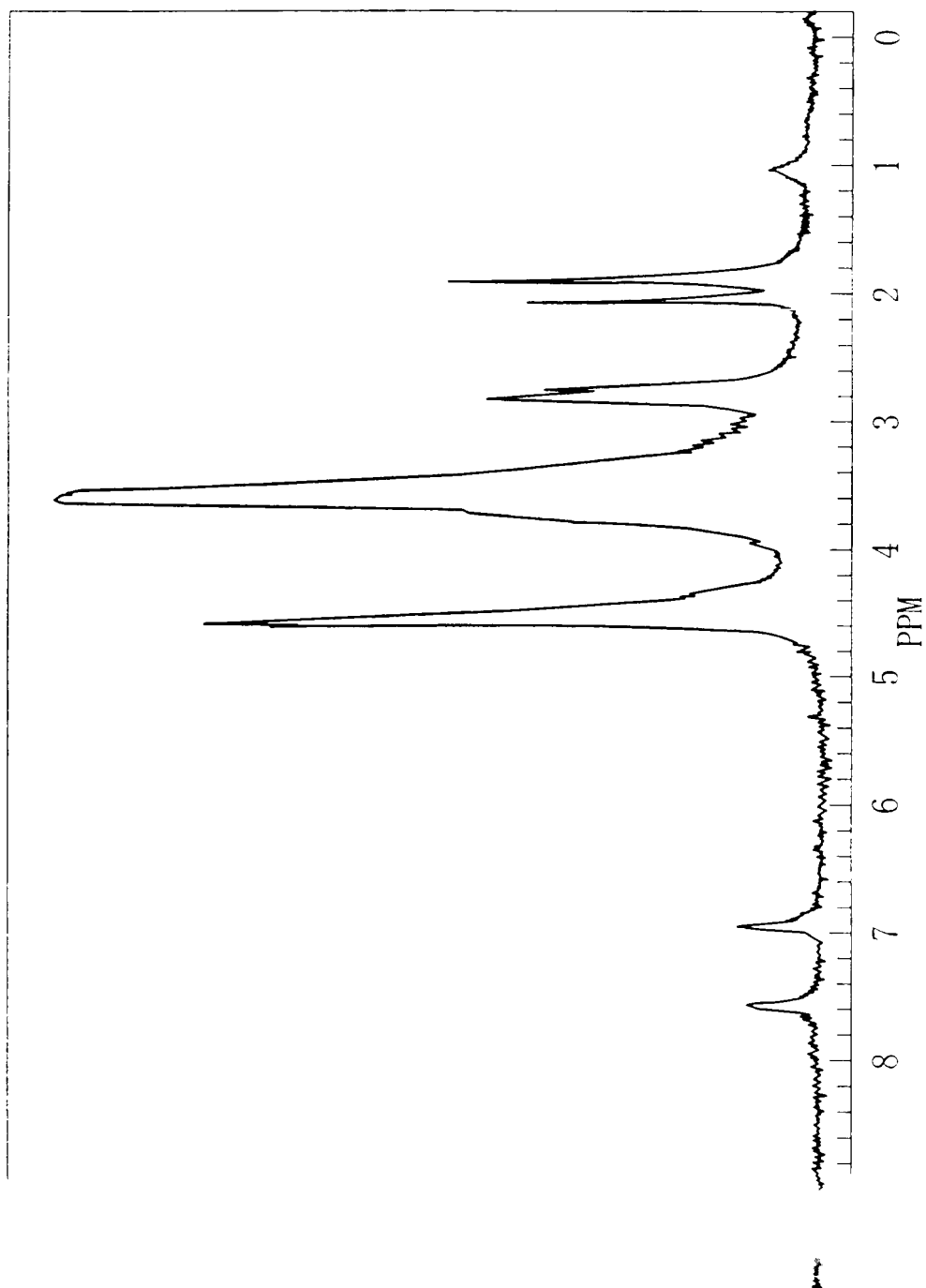
1 / 7





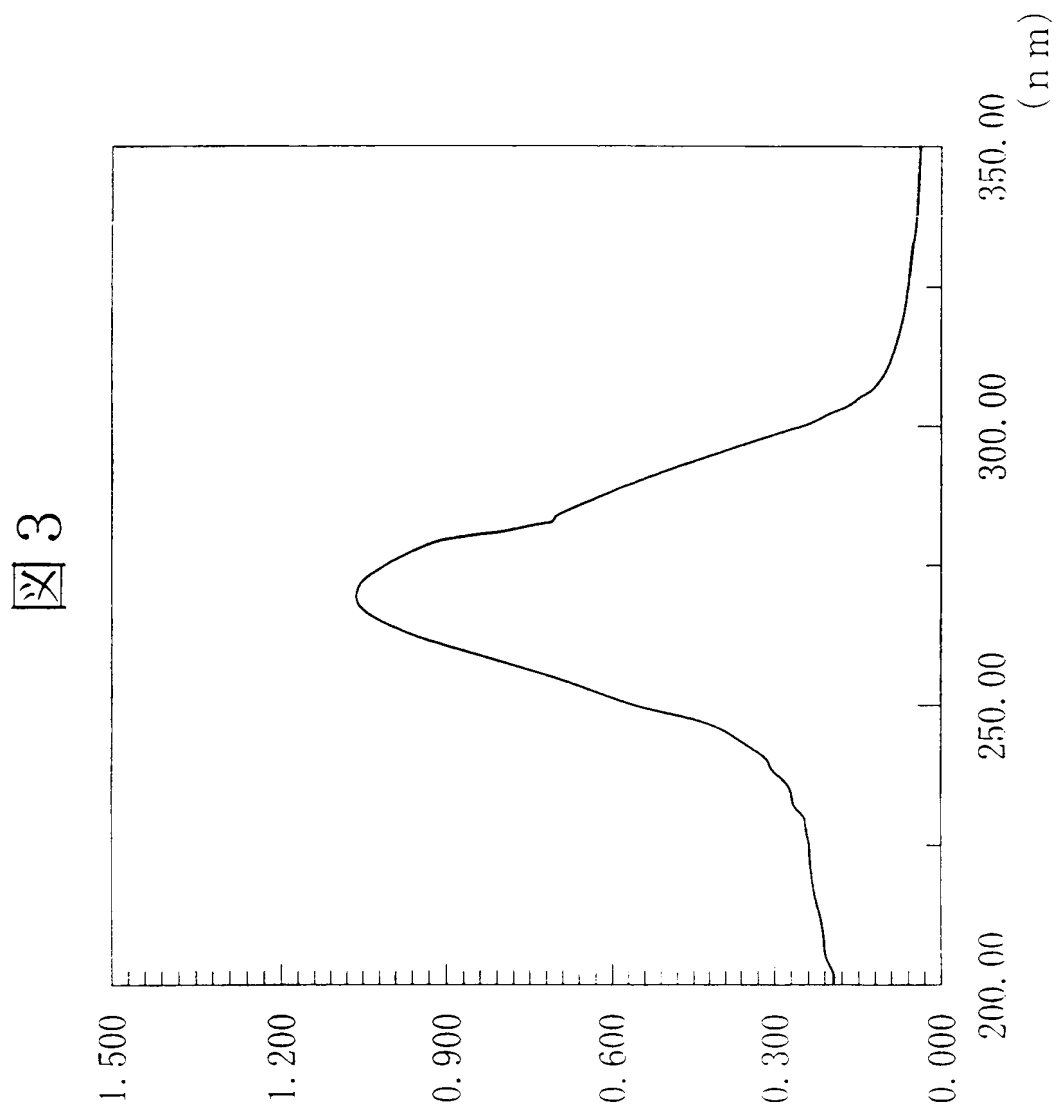
2 / 7

図 2





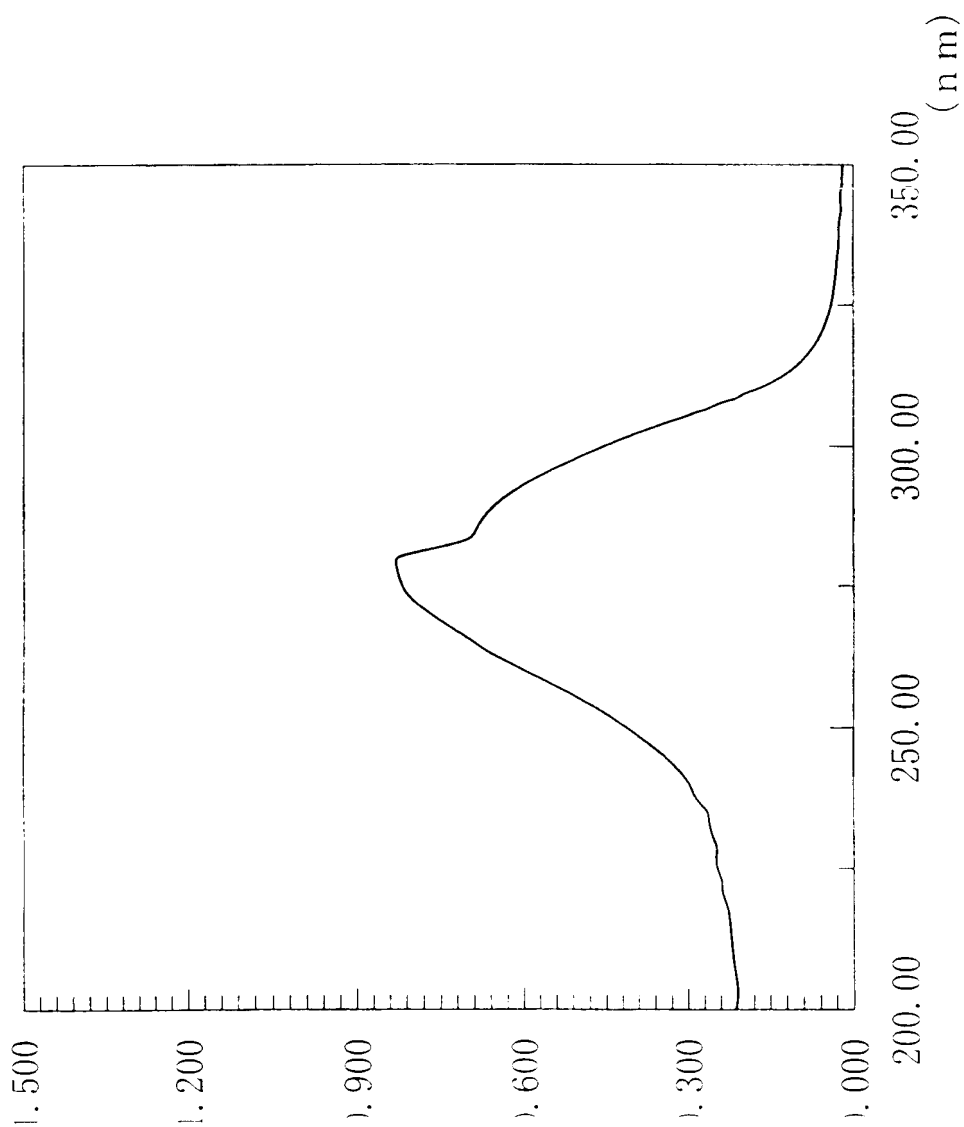
3 / 7





4 / 7

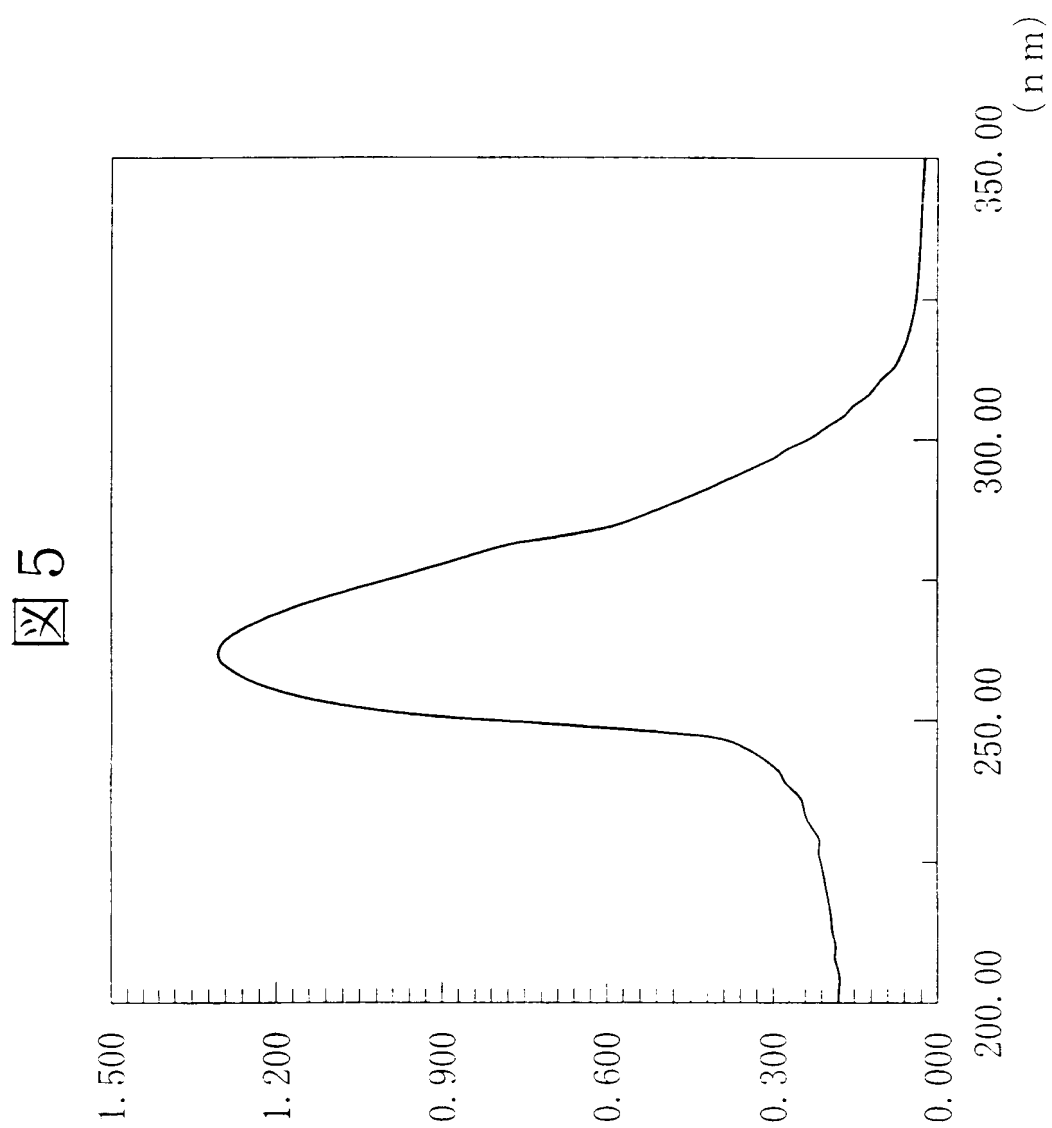
図 4





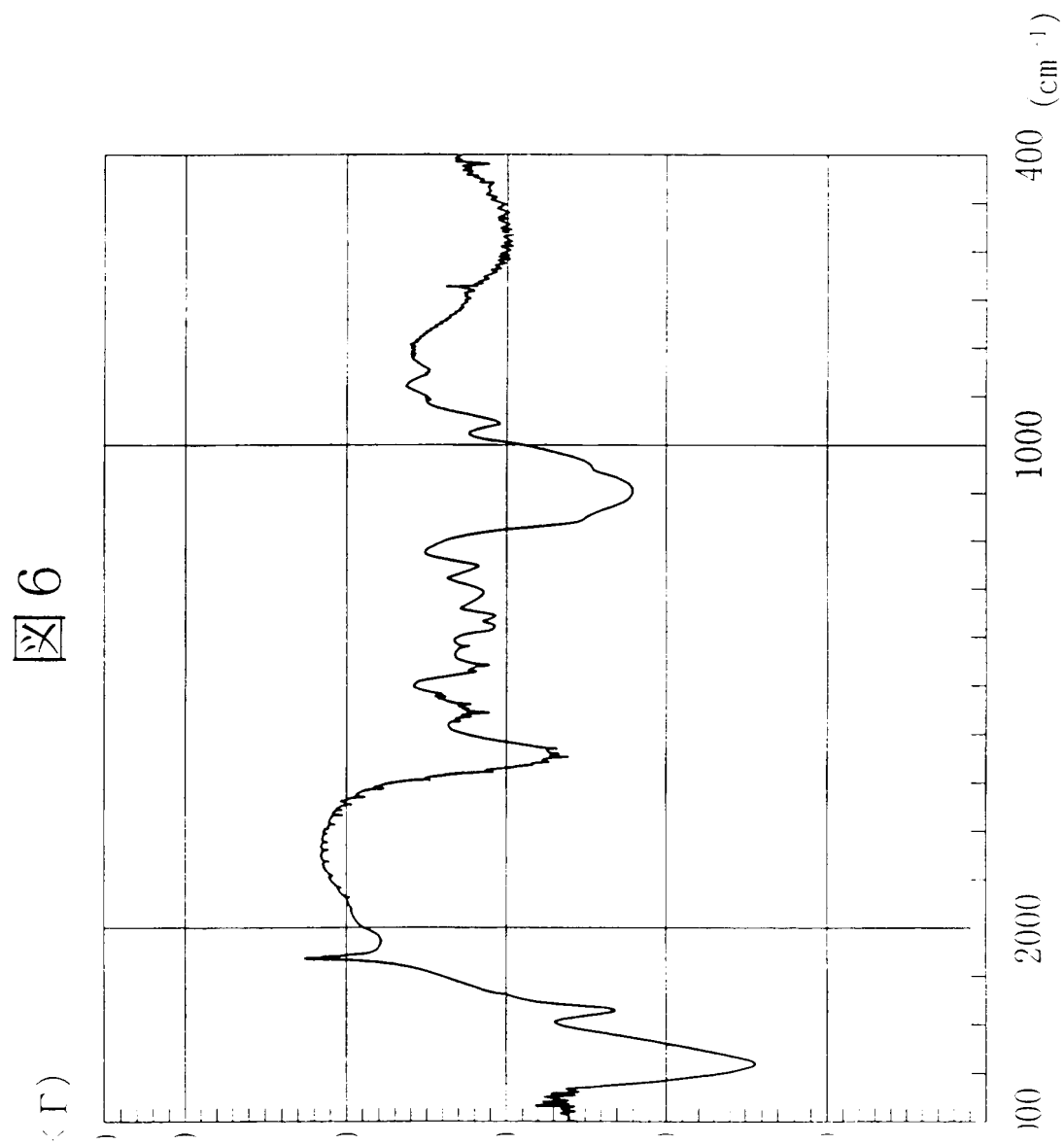


5 / 7



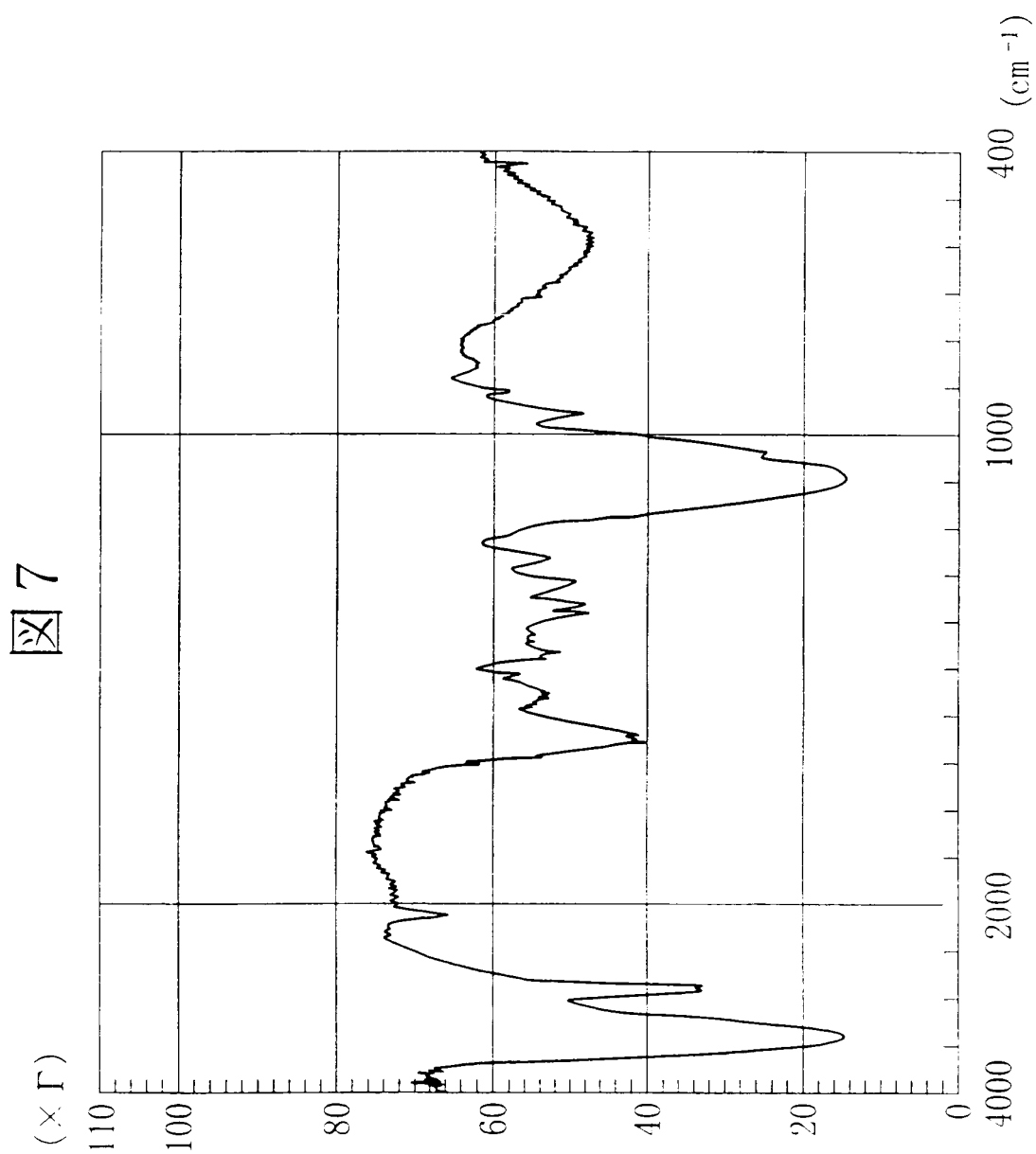


6 / 7





7 / 7





67

## 特 許 協 力 条 約

P C T

REC'D 13 JUL 2000

WIPO

P C T

## 国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)  
〔PCT36条及びPCT規則70〕

出願人又は代理人 の書類記号 PC-8296	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知(様式PCT/ IPEA/416)を参照すること。	
国際出願番号 PCT/J P 99/06197	国際出願日 (日.月.年) 08.11.99	優先日 (日.月.年) 10.11.98
国際特許分類(IPC) Int. Cl <sup>7</sup> C08B37/08		
出願人(氏名又は名称) 株式会社 ネーテック		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条(PCT36条)の規定に従い送付する。

2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 3 ページからなる。

☐ この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。  
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)  
この附属書類は、全部で \_\_\_\_\_ ページである。

3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。

I ☒ 国際予備審査報告の基礎

II ☐ 優先権

III ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成

IV ☐ 発明の単一性の欠如

V ☒ PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明

VI ☐ ある種の引用文献

VII ☐ 国際出願の不備

VIII ☐ 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日

国際予備審査報告を作成した日

〒100-8915  
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

電話番号 03-3581-1101 内線 3492





## I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT 14条)の規定に基づく命令に応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。  
PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

- ☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 出願時に提出されたもの  
明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 出願時に提出されたもの  
請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 PCT 19条の規定に基づき補正されたもの  
請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 出願時に提出されたもの  
図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 出願時に提出されたもの  
明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である \_\_\_\_\_ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語  
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語  
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表  
☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった  
☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された

- ☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ  
☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項  
☐ 図面 図面の第 \_\_\_\_\_ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上



V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性(N)

請求の範囲

1-12

有

請求の範囲

無

進歩性(IS)

請求の範囲

1-12

有

請求の範囲

無

産業上の利用可能性(IA)

請求の範囲

1-12

有

請求の範囲

無

2. 文献及び説明(PCT規則70.7)

請求の範囲1-12は国際調査報告に引用されたいずれの文献にも記載されておらず、当業者において自明な事項でもない。



Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference PC-8296	<b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA 416)	
International application No. PCT/JP99/06197	International filing date ( <i>day month year</i> ) 08 November 1999 (08.11.99)	Priority date ( <i>day month year</i> ) 10 November 1998 (10.11.98)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C08B 37/08		
Applicant NETECH INC.		

<p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of <u>3</u> sheets, including this cover sheet.</p> <p><input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of _____ sheets.</p>
<p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <p>I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report</p> <p>II <input type="checkbox"/> Priority</p> <p>III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</p> <p>IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention</p> <p>V <input type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability, citations and explanations supporting such statement</p> <p>VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited</p> <p>VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application</p> <p>VIII <input type="checkbox"/> Certain observations on the international application</p>

Name and mailing address of the IPEA/IP	Authorized officer
---	--------------------



## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP99/06197

## I. Basis of the report

1. With regard to the **elements** of the international application:\*

- ☒ the international application as originally filed
- ☐ the description:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the claims:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, as amended (together with any statement under Article 19  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the sequence listing part of the description:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language \_\_\_\_\_ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages \_\_\_\_\_
- ☐ the claims, Nos. \_\_\_\_\_

\* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).





# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP99/06197

## V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability: citations and explanations supporting such statement

### 1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-12	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-12	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-12	YES
	Claims		NO

### 2. Citations and explanations

The subject matter of claims 1 to 12 is not described in any of the documents cited in the ISR, nor is it obvious to a party skilled in the art.

